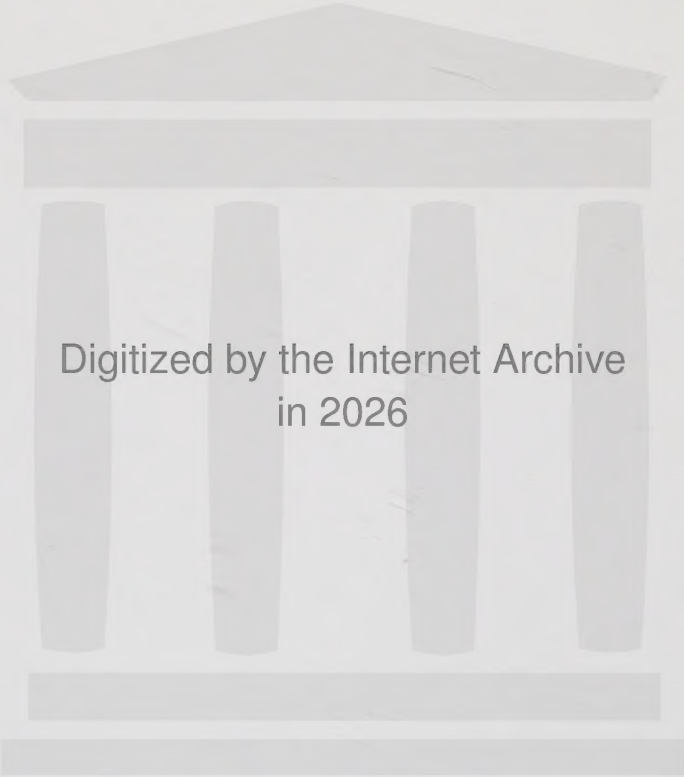


Die Histochemie mitochondrialer
Oxydoreduktasen im Leberläppchen
der Ratte

FRANK WEIDNER

1965



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555228_0058

Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut der
Universität München

Direktor: Prof. Dr. Dr. med. h.c. Th. Bücher

Die Histochemie mitochondrialer Oxydoreduktasen im
Leberläppchen der Ratte.

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilian-Universität zu München

vorgelegt von

Frank Weidner

aus

Tübingen

München

1965

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Universität München

Referent: Privat-Dozent Dr. Dirk P e t t e

Coreferent: Prof. Dr.Dr. med. h.c. Th. Bücher

Dekan: Professor Dr. Rudolf Zenker

Tag der mündlichen Prüfung: 12. Oktober 1965



Meinen lieben Eltern in Verehrung
und Dankbarkeit gewidmet.

I n h a l t s - V e r z e i c h n i s

Seite

Einleitung:

Enzymaktivitätsmuster - die metabolische Organisation von Geweben differenter Funktionen - Gewebsstruktur	1-4
Das Leberläppchen	5
Verschiedene Verfahren z. Enzymlokalisierung .	5
Enzyme vom Typ I, Typ II, Typ III	6
Der Vorteil der histochemischen Methode	7-8
Voraussetzungen für den histochemischen Test .	8
Das Gelschicht-Verfahren	10(37)
Farbstoff und Färbungsmechanismus	10-12

Methodik:

Tiermaterial	14
Herstellung des Gelfilms, Lagerung	14-15
Inkubation	15
Fixation	16
Extraktionsverfahren z. Nachweis mitoch. Akt..	16
Zusammensetzung der Testmedien und die jeweils katalysierte Reaktion	17-20

Ergebnisse:

Die Kontrollreaktionen	21-22
Die pyridinnucleotidabhängigen Oxydoredukt....	23-30

Die Tetrazolium-Reduktasen (TR)	23-25
Die TPN-spezif. Isocitrat-Dehydrogenase (T-IDH)	26
Die DPN-spezif. Isocitrat-Dehydrogenase (D-IDH)	28
Die Malat-Dehydrogenase (MDH)	28
Die Glutamat-Dehydrogenase (GluDH)	30
Die strukturgebundenen Oxydoreduktasen	31-34
Die Beta-Hydroxy-Butyrat-Dehydrogenase (HBDH).	31
Die Succino-Dehydrogenase (SDH)	33
Die Alpha-Glycerophosphat-Oxydase (GPOX)	34

Diskussion:

Die Tetrazolium-Reduktasen u. ihre Problematik	34 35
Das Gelschicht-Verfahren u. seine Problematik.	37
Drei Verteilungstypen der Oxydoreduktasen (OR)	39
Proportionskonstanz und Aktivitätsverteilung..	40
Die unterschiedliche Verteilung von GPOX und SDH in verschiedenen Leber-Parenchymzellen ...	43
Unterschiede der Mitochondrienzahl	44
Verschiedene Typen von Mitochondrien	44-45
Die unterschiedliche Verteilung von GPOX und SDH in der Rattenniere	44

Zusammenfassung:	47-49
Legende zu den Abbildungen	49-50
Literatur-Verzeichnis	51-52

Die Histochemie mitochondrialer Oxydoreduktasen am Leber-
läppchen der gesunden Ratte.

Vergleichende enzymologische Studien haben während der letzten Jahre zur Aufstellung und zur Begriffsbestimmung sogenannter Enzymmuster geführt (1-9). Unter dem Aspekt ihrer quantitativen Ordnung werden dabei Enzyme bestimmter Stoffwechselabschnitte und definierter Lokalisation in Geweben oder Zellen verschiedenen Typs miteinander verglichen. Die Unterscheidung "proportionskonstanter Enzymgruppen" von Enzymen spezifischer Proportion in ein und demselben bzw. in verschiedenen Stoffwechselabschnitten hat der Methode der vergleichenden Analyse von Enzymaktivitätsmustern besondere Bedeutung für die Analyse der metabolischen Organisation eines Gewebes verliehen, und Fragen der Differenzierung im Bereich der elementaren Stoffwechselprozesse beleuchtet. Tatsächlich ist die vergleichende Analyse von Enzymaktivitätsmustern zu einer Methode geworden, deren Aussagen den Bereich der reinen Phänomenologie des Enzymmusters überschreiten. Der Nachweis organspezifischer und funktionsspezifischer Proportionen innerhalb des Enzymaktivitätsmusters deutet Phänomene der Differenzierung der Gewebe bereits auf der Stufe elementarer Stoffwechselfunktionen an. In diesem Sinne ergeben sich nicht nur Beziehungen zwischen der Gestalt des Enzymaktivitätsmusters und der Gewebefunktion, sondern auch Entsprechungen von Enzymaktivitätsmuster und strukturellem Bau. Ebenso wie derartige Unterschiede beim Vergleich verschiedener Gewebe in den Enzymaktivitätsmustern gespiegelt werden, lassen sich entsprechen-

de Unterschiede dort erwarten, wo innerhalb ein und desselben Gewebes oder Organs Eigenarten des Bauplans Merkmale der Differenzierung andeuten. Im letzteren Falle handelt es sich dann nicht um eine Differenzierung der Gewebe, sondern um Differenzierung von Zellen eines Typs. Ein Beispiel dieser Art gibt sich im besonderen Bauplan des Organs Leber zu erkennen.

Die Anordnung des Parenchyms in den sogenannten "Sekundär-Läppchen", welche als primäre Funktions- und Bauelemente des Organs angesehen werden, läßt aus den Beziehungen des Parenchyms zu zwei funktionell differenten Systemen des Gefäßapparates eine möglicherweise funktionelle Differenzierung der Parenchymzellen verschiedener Abschnitte des Läppchens vermuten. Diese Vermutung wird durch die vor allem mit histochemischer Methodik von verschiedenen Autoren gewonnenen Befunde gestützt (10,11). In erster Linie wurden qualitativ Unterschiede in den Gehalten bestimmter Enzyme aufgedeckt. Diese, wenn auch nicht mit quantitativer Methode erhaltenen Befunde, weisen klar auf Unterschiede im Bereich des zellulären Enzymmusters der Parenchymzellen hin.

Damit stellt sich die Aufgabe, die vergleichende Analyse von Enzymaktivitätsmustern in den Bereich der zellulären Organisation auszudehnen. Methodisch stehen einem solchen Unterfangen erhebliche Schwierigkeiten entgegen, wenn der Vergleich auf quantitativer Ebene geführt werden soll (12). Andererseits sollten aufschlußreiche Einblicke bereits dann gewonnen werden, wenn methodisch gesicherte Aussagen über die intralobuläre Verteilung bestimmter Enzyme möglich werden. Das dieser Arbeit zugrundeliegende Thema bezweckt mit der Untersuchung der intralobulären Verteilung intramitochondrialer Oxydoreduktasen die Erweiterung bisheriger

Kenntnisse zum Ortsplan mitochondrial lokalisierter Abschnitte des energieliefernden Stoffwechsels im Leberläppchen.

Methodisch steht hiermit die Lokalisierung von Enzymen im Gewebe im Vordergrund. Zur Ortung der Aktivitäten von Oxydoreduktasen diene die histochemische Methode. Dies sei aus der im folgenden geführten Gegenüberstellung der verschiedenen Methoden zur Enzymortung näher begründet.

Verschiedene Verfahren zur Enzymlokalisierung.

a) Die Fraktionierte Gewebsextraktion und Homogenisation.

Hierbei werden dem Gewebe durch geeignete Extraktionsmedien zunächst lösliche, zytoplasmatische Enzyme entzogen, bevor durch eventuell abgestufte mechanische Zertrümmerung des Gewebes strukturell abgegrenzte Zellräume aufgeschlossen und deren lösliche Enzymaktivitäten freigesetzt werden (1,7). -- Das Verfahren dient letztlich der Enzymortung im Bereich der Cytotopik. Es hat den Nachteil, daß die Enzymortung sich auf die Analyse von Geweben und nicht definierten Zellen stützt. So werden zum Beispiel im Falle des hier zur Diskussion stehenden Leberparenchyms Bindegewebszellen, Gefäßendothelien, Kupffersche Sternzellen und andere nichtparenchymatische Strukturen unkontrollierbar in die Analyse einbezogen und erschweren eine exakte Beurteilung der intrazellulären Enzymverteilung in den Parenchymzellen. Mögliche Unterschiede im Enzymgehalt der Parenchymzellen selbst werden bei diesem Verfahren der Extraktion ohnehin nicht erkannt.

b) Das Verfahren der differentiellen Zentrifugation.

Durch Isolierung von Zellorganellen aufgrund unterschiedlichen Verhaltens im Schwerfeld gelingt eine noch detailliertere Enzymlokalisierung (13). Sie bleibt mit Sicherheit aber nur auf morphologisch definierte Zellräume beschränkt. So wird zum Beispiel auch mit dieser Methode eine Beurteilung der Lokalisation in nicht durch Membranen abgeschlossenen zytoplasmatischen Bereichen unmöglich sein. In gleicher Weise bleibt eine lokalisatorische Zuordnung der Enzymaktivitäten unter histotopischen Aspekten ausgeschlossen.

Andererseits wurden mit diesen Methoden weitgehende Einblicke in den lokalisatorischen Plan des energieliefernden Stoffwechsels der Zelle gewonnen (6,14,15). Hinsichtlich der für diese Stoffwechselfunktion bedeutsamen Zellkompartimente des extra- und intramitochondrialen Raumes gelang die Abgrenzung verschiedener Lokalisationstypen:

"Typ-I-Enzyme" sind als Komponenten des löslichen zellulären Proteins ausschließlich im extramitochondrialen Zellraum vertreten. Ihnen ist beispielsweise die Gesamtheit der Enzyme der Glykolyse zuzuordnen.

"Typ-II-Enzyme" sind ausschließlich intramitochondrial lokalisiert. Sie können als Bestandteile des sogenannten "löslichen mitochondrialen Proteins" nach Eröffnung der Mitochondrien relativ leicht in Lösung überführt werden. Als charakteristische Beispiele seien die Glutamat-Dehydrogenase, die DPN-spezifische Isocitrat-Dehydrogenase und das Condensing Enzyme angeführt.

Die Vertreter der "Typ-III-Enzyme" zeigen ein Extraktionsverhalten, das sich als Kombination von Typ I und Typ II deuten läßt: als intrazellulär "mehrrötig" lokalisiert weisen Typ-III-Enzyme neben einem intramitochondrialen Aktivitätsanteil einen leicht extrahierbaren extramitochondrialen Anteil auf. Vergleichende Untersuchungen (8,16) zeigen, daß das Verhältnis von extramitochondrialer und intramitochondrialer Aktivität für jedes dieser Enzyme eine gewebsspezifische Größe darstellt. Typische Beispiele sind die Malat-Dehydrogenase, die Glutamat-Oxalacetat-Transaminase, und im Falle der Leber auch die Fumarase.

Zur Abgrenzung intrazellulärer Verteilungstypen erweisen sich die Methoden der fraktionierten Gewebs-Extraktion und Homogenisation sowie der differentiellen Zentrifugation als ausreichend. Dennoch sind sie nicht in der Lage, beispielsweise eine exakte Lokalisierung extramitochondrialer Enzyme innerhalb des extramitochondrialen Raumes oder intramitochondrialer Enzyme innerhalb des intramitochondrialen Raumes klarzustellen. Ebenso wenig gelingt es mit diesen Methoden, Enzymverteilungsmuster unter histotopischem Gesichtspunkt, das heißt Enzymgehalte einzelner Zellen, Beziehungen des enzymatischen Apparates zur Gewebsarchitektur, oder Unterschiede des Enzymbestandes in den Parenchymzellen eines Organs beziehungsweise in den Zellen des nicht-parenchymatösen Gewebes aufzudecken.

c) Die histochemische Methode.

Ihr Vorteil besteht demgegenüber - gerade auch im Hinblick auf die Ortung von Enzymen im Bereich der Gewebseinheit -

in einer Lokalisierung in situ. Nur auf dem Wege einer Lokalisierung bzw. eines Aktivitätsnachweises in situ kann beispielsweise geprüft werden, inwieweit Parenchymzellen eines Gewebes hinsichtlich ihres Enzymmusters zumindest qualitativ identisch oder different sind.

Das dieser Arbeit zugrundeliegende Problem der Verteilung mitochondrialer Oxydoreduktasen im Leberläppchen der Ratte geht aus von Befunden der indirekten Enzymlokalisierung, wie sie mit Hilfe der zuvor erwähnten Methoden der Analyse von Zellfraktionen gewonnen wurden. Insofern stellt sich nicht die Frage, ob mitochondriale Enzymaktivitäten auch auf histochemischem Wege als solche lokalisatorisch den Mitochondrien zugeordnet werden können. Vielmehr zielt diese Untersuchung auf die Klärung der histotopischen Verteilung mitochondrialer Oxydoreduktasen. Methodisch ist eine derartige Studie zum gegenwärtigen Zeitpunkt allein auf der Ebene der histochemischen Analyse zu führen.

Zwei Möglichkeiten der Betrachtungsweise stehen für ein Studium der Enzymverteilung in situ zur Verfügung: die lichtmikroskopische Histochemie und die elektronenmikroskopische Cytochemie. Bezüglich der Fragestellung dieser Arbeit steht die histotopische Analyse im Vordergrund.

Die Voraussetzungen für den histochemischen Test.

- 1) Grundsätzlich wird die Spezifität der betrachteten Reaktion gefordert.
- 2) Der histochemische Test erstreckt sich entweder auf den Nachweis des Enzymproteins und führt damit zur direkten Ortung,

oder auf den Nachweis der katalytischen Enzymaktivität und stellt damit ein Verfahren der indirekten Enzymtötung dar. Beide Verfahrensweisen sind der Gefahr von Artefakten bei der Lokalisierung ausgesetzt. Die Verlagerung

a) des nachzuweisenden Enzyms, bzw. die Verlagerung

b) des Reaktionsproduktes der Nachweisreaktion

führt in jedem Falle zu einer irrtümlichen Lokalisierung und muß methodisch so weit wie möglich ausgeschlossen werden.

a) Eine Verlagerung des nachzuweisenden Enzyms selbst ist prinzipiell nur bei strukturgebundenen Enzymen ausgeschlossen. Alle Enzyme, die Bestandteil des löslichen zellulären Proteins sind, können unter den Bedingungen der allgemein üblichen histochemischen Nachweisverfahren eine artefizielle Verlagerung ihres Wirkortes erfahren. Das folgt bereits aus der Tatsache, daß der histochemische Enzymnachweis im allgemeinen am unfixierten Gewebsschnitt durchgeführt wird und eine Inkubation in wässrigen, meist hypotonischen Färbemedien zur Grundlage hat (17-19). Dieses Vorgehen bewirkt unweigerlich als Folge von Diffusionsvorgängen eine Extraktion der Enzyme aus dem Gewebe. Sie ist, wie später gezeigt werden wird, von erheblichem Ausmaß und kann sowohl im nativen wie auch in dem durch Einfrieren vorbehandelten Gewebe quantitativ verfolgt werden. Somit diffundieren im Falle der üblichen Färbeverfahren mit Inkubation nichtfixierter Gewebsschnitte in wässrigen Lösungen, lösliche Enzym-Anteile in das Färbemedium und sind dem histochemischen Nachweis in situ entzogen.

Das aus diesem und anderen Gründen von PETTE und BRANDAU

(20,21) entwickelte "Gelschicht-Verfahren" verfolgt den Zweck, die Enzymdiffusion beim histochemischen Nachweis auf ein Minimum einzuschränken. Als Färbemedium dient ein gleichmäßig dünner Gelfilm aus Agar-Agar, welcher das spezifische Substrat, das Coenzym, den Farbstoff und spezielle Zusätze enthält. Dieser Gelfilm wird mit dem Schnitt in Kontakt gebracht und ermöglicht so die Durchführung der histochemischen Nachweisreaktion unter Vermeidung einer Inkubation des Gewebsschnittes in wässrigen Medien.

- b) Eine Verlagerung des Reaktionsproduktes kommt bei Verwendung von Tetrazolsalzen zum speziellen Nachweis der Oxydoreduktasen weniger in Betracht als die Ablagerung des als Reaktionsprodukt gebildeten Farbstoffes an unspezifischem Ort.

Die von KUHN und JERCHEL erstmals an Pflanzen entdeckte Reduktion von Tetrazolsalzen in der Zelle (22) führt zur Bildung unlöslicher Reaktionsprodukte, der gefärbten Formazane, bzw. bei den heute bevorzugten Ditetrazolen zum Niederschlag entsprechender Diformazane (siehe Fig. 1!).

Während die Verlagerung des als wasserunlöslich niedergeschlagenen Formazans kaum wahrscheinlich ist, ergeben sich dennoch aus der Art des der jeweiligen Nachweisreaktion zugrundeliegenden Reaktionsmechanismus Möglichkeiten für eine irrtümliche Enzymortung. Sie resultieren aus dem Niederschlag des Farbstoffs am jeweiligen Ort seiner Reaktion. Das soll im folgenden ausführlicher erörtert werden.

Bei den Cytochrom-reduzierenden Oxydoreduktasen kommt eine Anfärbung dadurch zustande, daß der Substratwasserstoff unter Wirkung des nachzuweisenden Enzyms direkt auf das Tetr-

azolsalz übertragen wird. Als quasi unphysiologischer Wasserstoffakzeptor fungiert das Tetrazoliumsalz in direkter Partnerschaft der von Oxydoreduktasen dieses Typs katalysierten Reaktion. Der Niederschlagsort des Farbstoffs darf in diesem Falle zu Recht mit dem Wirkort des nachzuweisenden Enzyms gleichgesetzt werden.

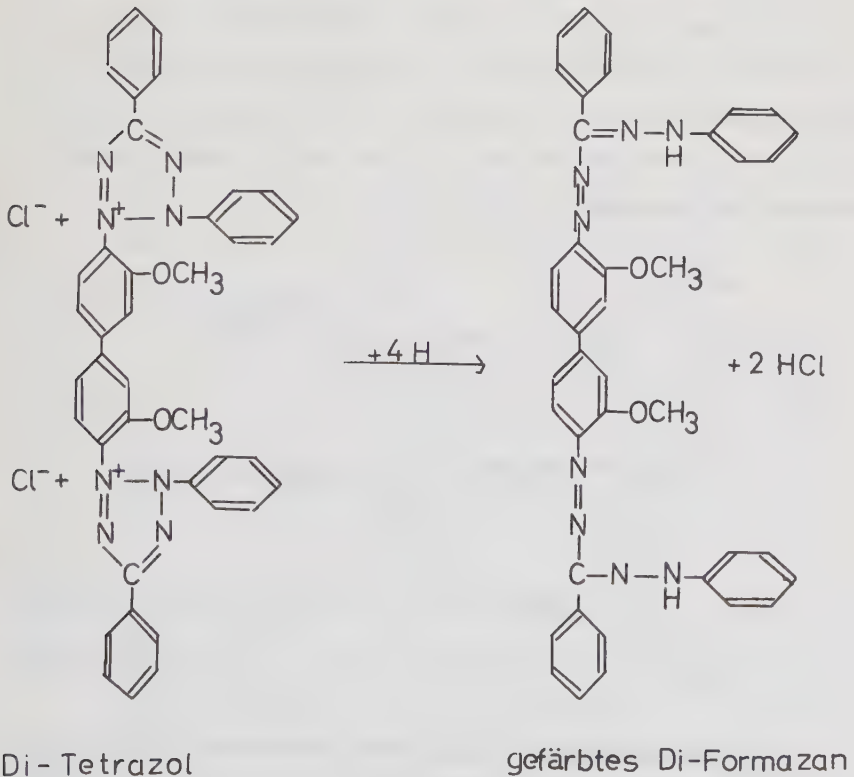


Fig. 1

Beim histochemischen Aktivitätsnachweis der Pyridin-nucleotidspezifischen Dehydrogenasen trifft diese Gegebenheit nicht zu. Ihr über die Reduktion von Tetrazolium zu Formazan ge-

fürher Aktivitätsnachweis verläuft zweistufig:

in der sogenannten "Meßreaktion" wird der Substratwasserstoff an das Pyridin-Coenzym abgegeben. (Substrat-Dehydrogenierung durch die pyridinnucleotid-spezifische Dehydrogenase). In der sich anschließenden "Indikatorreaktion" wird der Wasserstoff durch die katalytische Wirkung eines pyridinnucleotid-spezifischen Redoxmediators auf das Tetrazolsalz übertragen. (Wasserstoffübertragung durch pyridinnucleotid-spezifische Tetrazolium-Reduktasen. - Siehe hierzu Fig. 2!). Der Farbstoff lagert sich folglich nicht am Ort der pyridinnucleotid-spezifischen Dehydrogenase ab, sondern am Ort der als "Hilfsenzym" fungierenden Tetrazolium-Reduktase.

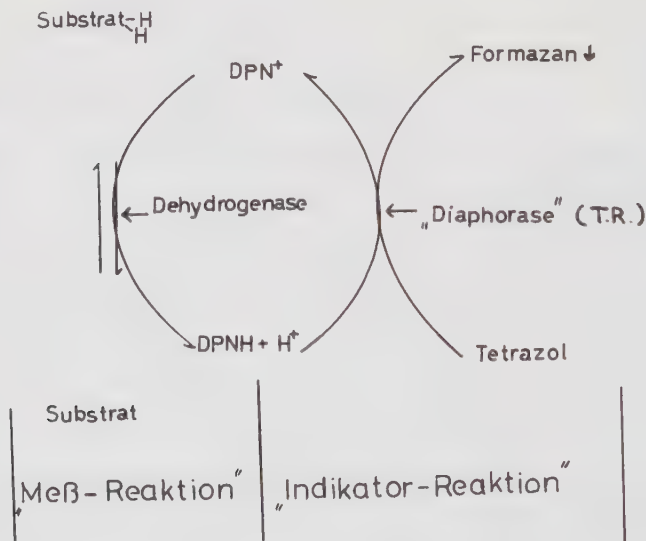


Fig. 2

Um den histochemischen Nachweis der pyridinnucleotid-spezifischen Dehydrogenasen unabhängig von der Verteilung ge-

webseigener Tetrazolium-Reduktasen zu gestalten, wird beim "Gelschicht-Verfahren" Phenacinnmethosulfat verwandt, das als Redoxmediator in gleichmäßiger Verteilung im Gelfilm wirkt und damit die heterogene Verteilung der gewebeeigenen Tetrazolium-Reduktasen kompensiert.

In der vorliegenden Untersuchung soll die von PETTE und BRANDAU erstmals aufgeworfene Frage nach der Heterogenität der Mitochondrien im Leberläppchen der Ratte eingehend geprüft werden. Zu diesem Zweck wurden mit denselben Methoden dieser Autoren (20,21,23) verschiedene mitochondriale Oxydoreduktasen hinsichtlich ihrer Verteilung über das Leberläppchen der gesunden Ratte histochemisch studiert.

Bei den mitochondrial strukturgebundenen Oxydoreduktasen erübrigte sich die Anwendung des Gelschicht-Verfahrens. Wie bereits erörtert, ist eine artefizielle Verlagerung dieser Enzyme durch Diffusion ausgeschlossen. Darüber hinaus erfolgt ihr Nachweis unabhängig von den pyridinnucleotid-spezifischen Tetrazolium-Reduktasen.

Demgegenüber kam bei allen untersuchten pyridinnucleotid-spezifischen Dehydrogenasen das Gelschicht-Verfahren zur Anwendung.

Im Falle des Nachweises mitochondrialer Enzymaktivitäten intrazellulär mehrörtiger Oxydoreduktasen (Typ-III-Enzyme) ging dem eigentlichen Färbevorgang eine Extraktion extramitochondrialer Enzymaktivitäten voraus.

M e t h o d i k

Als Tiermaterial kamen ausgewachsene, mit Standarddiät ernährte Wistar-Ratten beiderlei Geschlechts zur Verwendung. Das Töten erfolgte durch Genickschlag und Entbluten.

In rascher Präparation wurde dem linken Hauptlappen der Leber ein Würfel von etwa der Kantenlänge 0,8 cm entnommen und zum sofortigen Tieffrieren in mit flüssiger Luft gekühltes Isopentan getaucht. Die Herstellung der 10 nm dicken Gefrierschnitte geschah im Kryostat bei -20 Grad Celsius. Sie wurden dann auf Deckgläschen - durch kurzen Wärmekontakt von der Unterseite her - aufgezogen. Zur anschließenden Färbung der Gewebsschnitte dienten wahlweise die beiden schon erwähnten Verfahren:

a) mit der Färbelösung nach PEARSE (19).

In diesem wässrigen Medium entsprechender Zusammensetzung (siehe weiter unten!) konnten, bei Verwendung kleiner Kunststoffbehälter mit einem Füllvolumen von 2,0 ml, jeweils fünf Schnitte gleichzeitig inkubieren.

b) das Gelschicht-Verfahren nach PETTE und BRANDAU (20,21,23).

Hierbei kamen die Schnitte mit einem 0,2 mm dicken, 1,5%igen Agarfilm bei 30 Grad in einer dunklen, feuchten Kammer mit Stickstoff-Atmosphäre, in Kontakt.

Zur Herstellung des Gelfilms bewährte sich folgendes Vorgehen:

auf einer Aluminiumplatte, die auf etwa 42 Grad temperiert ist, werden p.a. gereinigte Objektträger (ca. 2x2 cm) vor-

gewärmt. In einem Reagenzglas überführt man einen Milliliter 3%igen Agar (Behring-Werke AG, Marburg/Lahn) für fünf Minuten im kochenden Wasserbad vom Gel- in den Solzustand. Gleichzeitig wird ein Milliliter einer Lösung zubereitet, welche den Farbstoff und das Pyridinnucleotid in der oxydierten, das spezifische Substrat der Dehydrogenase in der reduzierten Stufe, Puffer vom pH 7,6, Phenazinmethosulfat, Rinderalbumin und eventuell Aktivatoren etc. in für 2 ml Gesamtmedium berechneten Konzentrationen enthält. Dann kommt der heiße Agar schnell in das Wasserbad des Thermostaten von 42 Grad, bleibt dort etwa 30 Sekunden, bis unter Rühren die eben angesetzte Flüssigkeit zugegeben wird; dadurch erhalten Agar und Reaktionspartner ihre für das Reaktionsgel berechnete Endkonzentration. In rascher Folge läßt man nun das noch flüssige Agar-Medium aus einer vorgewärmten Pipette auf die temperierten Glasplättchen tropfen, legt zur Bestimmung der Schichtdicke einen U-förmig gebogenen, 0,2 mm starken Stahldraht auf und deckt sofort mit einem weiteren Glasplättchen ab, das schließlich mit einem 5-Gramm-Gewicht beschwert wird. Jetzt kühlt die Auflagefläche durch Umschalten auf Leitungswasser ab; dadurch kann sich der Agar wieder in den Gelzustand umwandeln.

Die gebrauchsfertigen Reaktionsgele waren bei Lagerung in einer dunklen, feuchten Kammer von +4 Grad etwa zwei Tage haltbar.

Zur Inkubation wurde eines der die Gelschicht bedeckenden Glasplättchen vorsichtig abgezogen. Etwa zwei Minuten danach erfolgte das Auflegen des bereits auf ein Deckgläschen aufgezo- genen Gefrierschnittes; hierbei ließ sich der Einschluß von Luftblasen nicht immer vermeiden. Die Inkubation dauerte -

auch beim herkömmlichen Färbeverfahren - bei 30 Grad Celsius 10 bis 30 Minuten.

Die Auswertung der gefärbten Schnitte geschah unter dem Photomikroskop, zumeist in Kontakt mit dem Gel. Sollte das im Gelschicht-Verfahren gefärbte Präparat längere Zeit aufbewahrt werden, so bewährte sich vorsichtiges Abheben des Schnittes vom Gel zusammen mit seinem Deckgläschen.

Die anschließende Fixation erfolgte dann wie bei der herkömmlichen Färbemethode durch 10-minütiges Verweilenlassen der Schnitte in 4%igem Formalin. Nach vorsichtigem Abspülen mit destilliertem Wasser wurde der Schnitt auf einem Objektträger mit Glycerin-Gelatine eingebettet.

Das Extraktionsverfahren zur speziellen Histochemie mitochondrialer Dehydrogenasen.

In dem von BÜCHER und PETTE vorgeschlagenen Extraktionsverfahren (1,7) wurde den auf Deckgläschen aufgezogenen 10- μ m-Gefrierschnitten vor dem Färben der zytoplasmatische Enzymanteil entzogen. Dabei kamen die Schnitte 50 Minuten in ein gekühltes, gepuffertes, isotonisches Saccharose-Medium (Saccharose 0,3 M, Triäthanolamin=TRAP 20 mM, Äthylendiamintetraazetat=EDTA 4 mM, pH 7,6). Dieses wurde von einem Magnetrührer stetig durchmischt. Anschließend wurden die Schnitte kurz in physiologischer Kochsalzlösung gewaschen und dann zum Enzymnachweis mit der Gelschicht inkubiert. (Speziell für die DPN-spezifische Isocitrat-Dehydrogenase enthielt obiges Saccharosemedium nach GOEBELL und KLINGENBERG (24) noch zusätzlich 2 Millimol Adenosindiphosphat und 10 Millimol

reduziertes Glutathion.

Zum Vergleich der Extraktionswirkung an Gefrierschnitten mit den quantitativen Ergebnissen PETTES für nichtgefrorenes Lebergewebe wurden die Saccharose-Medien nach Extraktion der Gefrierschnitte photometrisch auf ihre Enzymaktivitäten getestet.

Die Zusammensetzung der histochemischen Test-Medien in bezug auf die jeweils katalysierten Enzymreaktionen:

die im folgenden angegebenen Konzentrationen werden sowohl dem Färbeverfahren nach PEARSE wie dem Gelschicht-Verfahren nach PETTE und BRANDAU gerecht (23) und beziehen sich auf die endgültigen Konzentrationen der Substanzen in der Färbelösung wie im Gelfilm. Die jeweiligen Substrate zum spezifischen Dehydrogenasen-Nachweis wurden, wenn nötig und möglich, nach Überführung in die löslichen Natriumsalze, durch enzymatisch-optische Tests qualitativ und quantitativ kontrolliert (1,7,25). Als zweckmäßig hat sich beim Gelschicht-Verfahren der Zusatz von Albumin (5 mgr/ml) zum Reaktionsgemisch erwiesen. Außerdem enthielt das Reaktionsgemisch Phenazinmethosulfat (0,2 millimolar), 1,5%igen Agar-Agar, als Farbstoff Nitro-Blue-Tetrazole=Nitro-BT (1,4 millimolar) und Coenzym sowie spezifisches Substrat in jeweils wechselnder Konzentration.

Für den Fall mitochondrialer Oxydoreduktasen wurde statt Triäthanolamin-Puffer=TRAP regelmäßig Phosphatpuffer (0,1 M) verwendet.

DPNH-Tetrazolium-Reduktase (DPN-"Diaphorase")

Reaktion; $\text{DPNH} + \text{H}^+ + \text{Tetrazol} \text{-----} \text{DPN}^+ + \text{Formazan}$

Medium: Phosphatpuffer 0,1 M - pH 7,6; Nitro-BT 1,4 mM;
DPNH 0,8 mM.

TPNH-Tetrazolium-Reduktase (TPN-"Diaphorase")

Reaktion: $\text{TPNH} + \text{H}^+ + \text{Tetrazol} \text{-----} \text{TPN}^+ + \text{Formazan}$

Medium: Phosphatpuffer 0,1 M - pH 7,6; Nitro-BT 1,4 mM;
TPNH 0,8 mM.

Abgewandeltes Medium für das Gelschicht-Verfahren (ohne Phenazinmethosulfat): Phosphatpuffer 0,1 M - pH 7,6; Nitro-BT 1,4 mM; TPN^+ 0,3 mM; Glukose-6-Phosphat 2 mM; G-6-P-Dehydrogenase (Boehringer) 1 E/ml; Albumin 5 mgr/ml; Agar 1,5 %.

Glutamat-Dehydrogenase (GluDH)

Reaktion: $\text{L-Glutamat} + \text{H}_2\text{O} + \frac{\text{DPN}^+}{\text{TPN}^+} \text{-----} \alpha\text{-Ketoglutarat} + \text{NH}_4^+ + \frac{\text{DPNH}}{\text{TPNH}}$

$\frac{\text{DPNH}}{\text{TPNH}} + \text{H}^+ + \text{Tetrazol} \text{-----} \text{Formazan} + \frac{\text{DPN}^+}{\text{TPN}^+}$

Medium: Phosphatpuffer 0,1 M - pH 7,6; EDTA 5 mM; Nitro-BT 1,4 mM; DPN^+ 1,5 mM; Adenosindiphosphat (ADP) 2 mM (27); L-Glutamat (mit 2n NaOH auf pH 7,6 gebracht) 50 mM; Phenazinmethosulfat (PMS) 0,2 mM; Albumin 5 mgr/ml; Agar 1,5 %.

Malat-Dehydrogenase (MDH)

Reaktion: L-Malat + DPN^+ ----- Oxalacetat + DPNH + H^+
 $\text{DPNH} + \text{H}^+ + \text{Tetrazol}$ ----- Formazan + DPN^+

Medium: Phosphatpuffer 0,1 M - pH 7,6; EDTA 5 mM; Nitro-BT 1,4 mM; DPN^+ 1,5 mM; L-Malat (mit 4n NaOH auf pH 7,0 gebracht) 100 mM; PMS 0,2 mM; Albumin 5 mgr/ml; Agar 1,5 %.

TPN-spezifische Isocitrat-Dehydrogenase (T-IDH)

Reaktion: D-Isocitrat + TPN^+ $\xrightarrow{\text{Mg}^{++}}$ alpha-Ketoglutarat
+ CO_2 + TPNH + H^+
 $\text{TPNH} + \text{H}^+ + \text{Tetrazol}$ ----- Formazan + TPN^+

Medium: Phosphatpuffer 0,1 M - pH 7,6; MgSO_4 8 mM; Nitro-BT 1,4 mM; TPN^+ 1,0 mM; D-Isocitrat 10 mM; PMS 0,2 mM; Agar 1,5 %; Albumin 5 mgr/ml.

DPN-spezifische Isocitrat-Dehydrogenase (D-IDH)

Reaktion: D-Isocitrat + DPN^+ $\xrightarrow[\text{ADP}]{\text{Mg}^{++}}$ alpha-Ketoglutarat
+ CO_2 + DPNH + H^+
 $\text{DPNH} + \text{H}^+ + \text{Tetrazol}$ ----- Formazan + DPN^+

Medium: Phosphatpuffer 0,1 M - pH 7,6; ADP 2 mM; MgSO_4 8 mM; Nitro-BT 1,4 mM; DPN^+ 1,5 mM; D-Isocitrat 1,3 mM; PMS 0,2 mM; Albumin 5 mgr/ml; Agar 1,5 %.

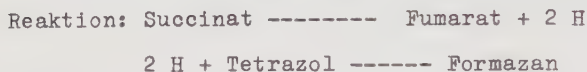
D-(-)-beta-Hydroxybutyrat-Dehydrogenase (beta-HBDH)

Reaktion: D-L-beta-Hydroxybutyrat + DPN^+ ----- Acetoacetat + $\text{DPNH} + \text{H}^+$



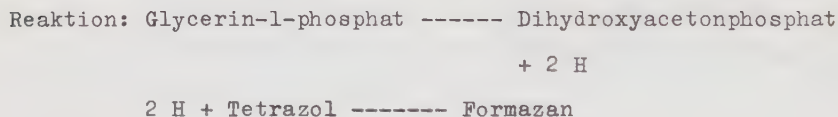
Medium: Phosphatpuffer 0,1 M - pH 7,6; DPN^+ 1,5 mM; Nitro-BT 1,4 mM; D-L-Butyrat 20 mM; PMS 0,2 mM; Albumin 5 mgr/ml; Agar 1,5 %.

Succino-Dehydrogenase (SDH)



Medium: Phosphatpuffer 0,1 M - pH 7,6; Nitro-BT 1,4 mM; KCN 1 mM; Succinat 50 mM.

alpha-Glycerophosphat-Oxydase (alpha-GPOX)



Medium: Phosphatpuffer 0,1 M; Nitro-BT 1,4 mM; Glycerin-1-Phosphat 50 mM.

Zur Kontrolle an Parallelschnitten dienten jeweils angegebene Medien ohne den Substrat- bzw. Coenzymzusatz.

E r g e b n i s s e

Alle Ergebnisse wurden an der Rattenleber gewonnen. Da Lebern alter Tiere regelmäßig störende Fettansammlungen aufweisen und zu junge Organe nach Feststellung von SCHUMACHER und Mitarbeitern (10,11) noch keinen konstanten Enzymbesatz haben, wurden hier ausgewachsene Tiere verwendet.

Alle getesteten Enzyme zeichnen sich in ihrer histochemischen Verteilung über das Leberläppchen der Ratte durch Charakteristika aus, die unbeachtet des Individuums und des verwendeten Leberlappens auftreten. So weisen die Lebern männlicher und weiblicher Tiere keine histochemisch erkennbaren Unterschiede auf.

A) Kontrollreaktionen

- 1) Das substratfreie, pyridinnucleotidhaltige Gel bewirkt am nichtextrahierten Schnitt jeweils nur mäßig perizentrale Anfärbung des Parenchyms. Nach kurzfristiger Extraktion der Schnitte bleibt eine Farbreaktion überhaupt aus. Legt man zugrunde, daß die in Gegenwart von Pyridinnucleotid, jedoch in Abwesenheit von Substrat zu beobachtende schwache Anfärbung auf der Oxydation endogener Substrate durch ihre entsprechenden Enzyme bewirkt wird, so ist das Ausbleiben einer solchen von endogenen Substraten abhängigen Reduktion des Tetrazoliums nach Extraktion des Schnittes



Abb. 1



Abb. 2

ohne weiteres verständlich.

- 2) Das pyridinnucleotidfreie, substrathaltige Gel führt prinzipiell zu ähnlichen Resultaten. Da auch in diesem Falle nach kurzer Extraktion des Schnittes eine Farbreaktion nicht auftritt, muß entsprechend eine Extraktion der gewebeeigenen Pyridinnucleotide angenommen werden.
- 3) Das pyridinnucleotidfreie, substratfreie Gel bewirkt allenfalls eine sehr geringe und perizentral betonte Anfärbung des Parenchyms.

B) Die pyridinnucleotid-abhängigen Oxydoreduktasen

1) Die DPNH-Tetrazolium-Reduktase (DPN-"Diaphorase")

Abbildung 1 zeigt die enzymespezifische Anfärbung des Leberläppchens, wie sie nach 10-minütiger Inkubation in herkömmlichem Medium resultiert. Das Bild des 120-fach vergrößerten Präparates läßt im linken Abschnitt deutlich die Gefäße eines Portalfeldes, rechts eine Zentralvene erkennen. Die diesen Gebilden benachbarten Leberzellen erscheinen unterschiedlich stark angefärbt. Dabei treten die Zellen im perizentralen Gebiet des Leberläppchens gegenüber den periportalenen Zellen intensiv hervor. - Abb. 2¹ liegt ein Schnitt zugrunde, der für den ausschließlichen Nachweis intramitochondrialer Aktivitäten dieses Enzyms nach 60-minütiger Extraktion in isotonischem Saccharosemedium den gleichen Inkubationsbedingungen unterworfen war. Das Photo zeigt in 50-facher Vergrößerung grundsätzlich die



Abb. 3

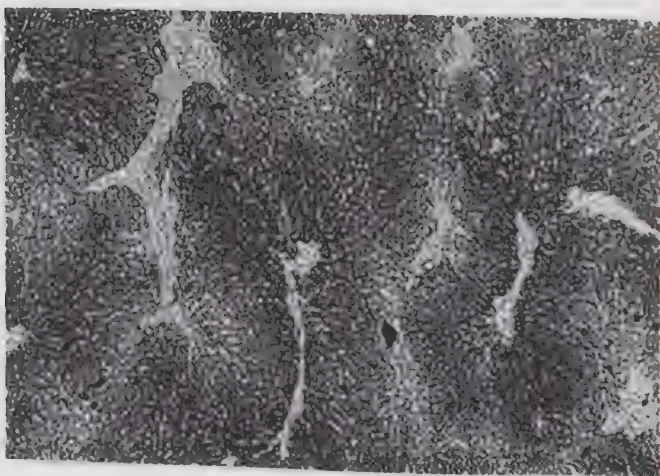


Abb. 4

gleiche histotopische Aktivitätsverteilung. (Zwei Portalfelder im rechten Bildabschnitt dienen zur Orientierung). Der Grad der Anfärbung ist insgesamt schwächer ausgeprägt. - Abb. 3 zeigt in 340-facher Vergrößerung einen Ausschnitt aus einem Glissonschen Feld mit angrenzenden, relativ dunkel erscheinenden Leberzellen. Links findet sich eine Leberarterie, rechts ein Lebervenenast quergeschnitten. Auffällig ist die im Vergleich zur Vene starke Anfärbung der Arterie. Die in der Arterienwandung angefärbten Strukturen lassen sich ohne Zweifel der Muscularis zuordnen.

2) Die TPNH-Tetrazolium-Reduktase (TPN-"Diaphorase")

Abbildung 4 demonstriert in 50-facher Vergrößerung die Aktivitäts-Verteilung dieses Enzyms bei Anwendung des Gelschicht-Verfahrens mit TPNH-regenerierendem System, jedoch ohne Zusatz von PMS. Bei der Anordnung enthielt der Gelfilm Glukose-6-Phosphat, TPN^+ sowie G-6-P-DH in einer Aktivität von 1 E/ml, außerdem Phosphatpuffer und Albumin. Im Vergleich zur DPNH-Tetrazolium-Reduktase resultiert bei gleichlanger Inkubation des nichtextrahierten Schnittes eine nur mäßig starke Anfärbung. Jedenfalls zeigen auch hier die perizentralen Leberzellen eine intensivere Kolorierung als die periportalen Zellen. Die 60-minütige Vorextraktion des Schnittes zur Elution extra-mitochondrialer Enzymaktivität ändert an der Aktivitätsverteilung grundsätzlich nichts. Quantitativ bestehen jedoch deutliche Unterschiede zwischen Enzymnachweis im nativen und im vorextrahierten Schnitt. Bei gleicher Inku-

bationszeit ist nämlich die Anfärbung im vorextrahierten Schnitt wesentlich schwächer, was darauf hinweist, daß mit der Extraktion ein erheblicher Anteil der Enzymaktivität den Zellen entzogen wird.

3) Die TPN-spezifische Isocitrat-Dehydrogenase (T-IDH)

Abb. 5 zeigt bei 30-facher Vergrößerung den im Gelschicht-Verfahren geführten Aktivitätsnachweis der T-IDH. Das Muster der Farbstoffverteilung demonstriert deutlich die heterogene Aktivitätsverteilung dieses Enzyms im Leberläppchen. Bereits nach zweiminütigem Kontakt des Schnittes mit dem Färbegel resultiert das hier gezeigte Bild. Deutlich erkennbar ist der höhere Aktivitätsgehalt der perizentralen Zellen. Von Interesse ist, daß im Laufe einer verlängerten Inkubation von Schnitt und Gelschicht die zunächst auffälligen Unterschiede in der Anfärbung von periportal und perizentraler Region zurücktreten. Diese Beobachtung findet zum Teil Erklärung darin, daß die dem Aktivitätsnachweis zugrundeliegende Oxydation des Isocitrats von der T-IDH sehr rasch katalysiert wird. Die am Ausmaß des Farbstoffniederschlags abschätzbare Enzymaktivität ist damit nur während der ersten Minuten der Inkubation verlässlich. Der Nachweis der T-IDH am vorextrahierten Schnitt führt nur noch zu einer äußerst geringfügigen, jedoch perizentral betonten Anfärbung. Dieser Befund steht in gutem Einklang mit der bisher bekannten intrazellulären Verteilung des Enzyms.



Abb. 5



Abb. 6

4) Die DPN-spezifische Isocitrat-Dehydrogenase (D-IDH)

Alle Versuche, den histochemischen Aktivitätsnachweis dieses Enzyms zu führen, ergaben negative Resultate. Tatsächlich mag die außerordentliche Instabilität der D-IDH (24), wie sie zumindest aus Untersuchungen in vitro bekannt ist, diese Beobachtung erklären. Selbst Zusätze von den aus kinetischen Untersuchungen (24) bekannten Aktivatoren und stabilisierenden Substanzen blieben ohne Erfolg. Die in jedem Falle erhaltenen Ergebnisse zeigten in ihrem Anfärbungsmodus keinerlei Unterschiede gegenüber entsprechenden Kontrollreaktionen in Abwesenheit von Substrat oder Pyridinnucleotid.

5) Die Malat-Dehydrogenase (MDH)

MDH ist ebenso wie T-IDH ein Enzym vom Typ III, das heißt Aktivitäten sind sowohl im extra- als auch im intramitochondrialen Raum der Zelle vertreten. Abb. 6 zeigt bei 30-facher Vergrößerung den histochemischen Aktivitätsnachweis dieses Enzyms, wobei die Anfärbung am nicht vor-extrahierten Schnitt intra- und extramitochondriale Aktivitäten der MDH zugleich erfaßt. Wie ersichtlich, resultiert eine gleichmäßige und geringgradig perizentral stärkere Anfärbung. Berücksichtigt man die Farbverteilung der besprochenen Kontrollreaktionen für pyridinnucleotid-abhängige Oxydoreduktasen, so darf angenommen werden, daß die intralobuläre Verteilung der Malat-Dehydrogenase gleichmäßig ist. Extraktion des Schnittes und anschlies-

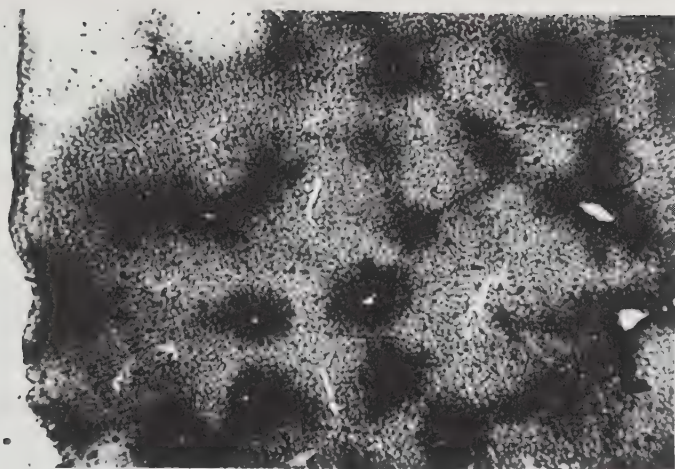


Abb.7

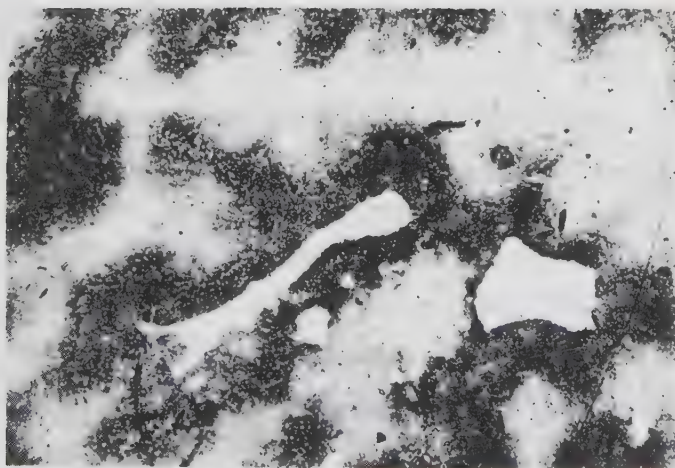


Abb.8

sender MDH-Nachweis führen zu unterschiedlichen Resultaten. In einigen Fällen ist Enzymaktivität überhaupt nicht mehr nachweisbar, während in anderen Fällen bei wesentlich schwächerer Färbung der gleiche Verteilungstyp wie am nichtextrahierten Schnitt gefunden wird. Offensichtlich erklären sich diese Unterschiede durch die unterschiedliche Schädigung verschiedener Gewebeproben, die in erster Linie ihre Ursache im Prozeß des Einfrierens des Gewebes haben. Je nach Grad der Schädigung durch das Einfrieren bestehen von Gewebeprobe zu Gewebeprobe Unterschiede in der artefiziell bedingten Eröffnung des mitochondrialen Kompartiments, sodaß selbst bei Bedingungen, die am normalen Gewebe nur zur Extraktion extramitochondrialer Enzyme führen, in diesem Falle auch intramitochondriale Enzyme quantitativ verfolgbar extrahiert werden. Dies gilt für alle löslichen mitochondrialen Enzyme, also auch für die Glutamat-Dehydrogenase und die beiden Isocitrat-Dehydrogenasen. Nur spielt im Falle der MDH die an und für sich entgegen dem Gleichgewicht verlaufende histochemische Nachweisreaktion wegen ihrer verminderten Kinetik eine zusätzlich abschwächende Rolle.

6) Die Glutamat-Dehydrogenase (GluDH)

Abb. 7 zeigt in 25-facher Vergrößerung eine stark kontrastierte Farbverteilung über das Lappchen. Sie ist das Ergebnis des im Gelschicht-Verfahren geführten Aktivitätsnachweises der GluDH. Im Gebiet um die Zentralvenen tritt

die Anfärbung kräftig hervor, während sie in den periportalen Feldern wesentlich schwächer ist. Daß sie hier nicht ganz fehlt, sieht man deutlich im Vergleich zum linken oberen Bildabschnitt, wo ein Kontakt des Schnittes mit dem Färbegel ausgeblieben war. Obwohl die Aktivität dieses Typ-II-Enzyms zu 100 % innerhalb der Mitochondrien lokalisiert ist, läßt sich eine Anfärbung nach Vorextraktion des Schnittes nur in Anwesenheit von Adenosindiphosphat, des "allosterischen" Aktivators der GluDH nachweisen (27). Dies sei lediglich im Hinblick auf die zuvor erläuterte Schädigung der Mitochondrienmembranen und die darauffolgende Elution löslicher mitochondrialer Enzyme als weiteres Beispiel erwähnt.

C) Die strukturgebundenen Oxydoreduktasen

I) Die D-(-)-beta-Hydroxybutyrat-Dehydrogenase (beta-HBDH)

Schon die kurzfristige Inkubation (3 min.) nichtextrahierter Schnitte führt zu einer kontrastreichen, scharf abgegrenzten Farbverteilung, wie sie in Abbildung 8 gezeigt wird. In der Mitte des 100-fach vergrößerten Abbildes imponieren eine längs- und eine quergeschnittene sublobuläre Schaltvene. In ihrer Umgebung befinden sich kräftig gefärbte Leberzellen. Allmähliche Übergänge der Farbtintensität zu den kaum oder überhaupt nicht angefärbten periportalen Zellen fehlen bei diesem strukturgebundenen, pyridinnucleotidabhängigen mitochondrialen Enzym. Aktivität der beta-HBDH ist somit streng auf die Zellen der peri-



Abb. 9

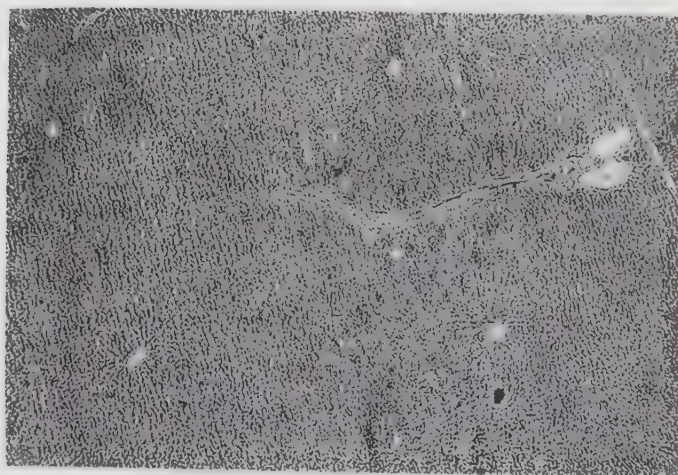


Abb. 10

zentrale Region beschränkt. Die Portalgefäße sind wegen des fehlenden Kontrastes zur Umgebung nur im Phasenkontrast-Verfahren als solche erkennbar.

Damit zeigt dieses Enzym die wohl am stärksten ausgeprägten Unterschiede in dem Vergleich von periportal und perizentralen Zellen des Leberparenchyms.

Für eine Zerstörung der Mitochondrienmembranen durch das Tieffrieren des Gewebes spricht die histochemische Nachweisbarkeit dieser Oxydoreduktase, welche nach LEHNINGER und Mitarbeitern (28) ohne Verwendung von KCl für externes DPN^+ nicht zugänglich sein dürfte.

II) Die Cytochrom-reduzierenden Oxydoreduktasen

1) Die Succino-Dehydrogenase (SDH)

Wie aus Abbildung 9 in 80-facher Vergrößerung ersichtlich ist, zeigt die Aktivitätsverteilung dieses Enzyms einen besonderen Typ. Regelmäßig führt der histochemische Aktivitätsnachweis der intramitochondrial strukturgebundenen SDH zu einer kräftigen Anfärbung der Leberzellen im Bereich um die portalen Felder. (Die rechte Bildhälfte in Abb. 9 läßt ein solches in besonderer Ausdehnung erkennen.) Im Gegensatz dazu sind die perizentralen Zellen nur schwach angefärbt. Damit offenbart sich in dem für dieses Enzym charakteristischen und von anderen Autoren bereits beschriebenen Muster der intralobulären Anfärbung (11) eine Verteilung, die durch hohe Aktivität in der Peripherie und durch niedrige Aktivität im Zentrum des Läppchens gekennzeichnet ist. Sie ist genau der Verteilung der GluDH entge-

gengerichtet (vergl. Abb. 7 !).

2) Die alpha-Glycerophosphat-Oxydase (GPOX)

Abb. 10 demonstriert in 50-facher Vergrößerung das Aktivitäts-Histogramm dieses ebenfalls strukturgebundenen mitochondrialen Enzyms. Wie ersichtlich, resultiert eine relativ schwache Farbgebung, die auch nur nach relativ langer Inkubation (20 min.) beobachtet wird. Die Aktivität der alpha-GPOX ist, wie aus Abb. 10 ersichtlich, völlig gleichmäßig über das Leberläppchen verteilt. (Ein Portalfeld sowie einige Zentralvenen lassen sich auf dem Photo gut erkennen). Die relativ schwache Anfärbung findet ihre Erklärung in der niedrigen Aktivität der GPOX der normalen Leber. So ist dieses Enzym in der Leber mit nur etwa $1/25$ der Aktivität der SDH vertreten, wie quantitative Aktivitätsbestimmungen ergeben.

D i s k u s s i o n

Die für verschiedene Oxydoreduktasen erhobenen Befunde werfen die Frage auf, inwieweit das histochemische Muster die gewebliche Enzymverteilung letztlich repräsentiert. Sind die zu untersuchenden Leberläppchen miteinander vergleichbar? - Die übereinstimmende Histotopik beim Studium gänzlich verschiedener Leberlappen bejaht diese Frage. Insofern kann also die für die einzelnen Läppchen des linken Hauptlappens gezeigte histoto-

pische Lokalisation auch als repräsentativ für die übrigen Lappen gelten.

Die Tetrazolium-Reduktasen

Die DPNH- und die TPNH-Tetrazolium-Reduktase sind möglicherweise Untereinheiten aus dem strukturellen Verband des GREENSchen Multienzymkomplexes der alten VON EULERSchen "Diaphorase". Ihre physiologische Funktion besteht freilich nicht darin, Tetrazole zu reduzieren. Diese Fähigkeit kann ihnen vielmehr deshalb zuerkannt werden, weil das Tetrazol-Formazan-System mit seinem elektrischen Normalpotential zwischen Cytochrom c und DPNH-TPNH steht und daher - bei physiologischem pH - mit anderen physiologischen Wasserstoffakzeptoren der Atmungskette konkurriert.

Unklar bleibt, welche Bedeutung den relativ hohen Aktivitätsgehalten der Diaphorasen im Zentrum des Leberläppchens zukommt. Der Nachweis beider Diaphorasen an extrahierten Gewebsschnitten zeigt, daß auch die mitochondrialen Anteile beider Enzyme diesen intralobulären Verteilungstyp aufweisen. Inwieweit für beide Enzyme aus der vergleichenden Betrachtung extrahierter und nichtextrahierter Schnitte auch eine diesbezügliche Aussage für die extramitochondrialen oder leicht extrahierbaren Anteile möglich ist, bleibt fragwürdig. Die optische Betrachtung der angefärbten Schnitte muß im Hinblick darauf besonders kritisch bewertet werden, da gleiche Aktivitätsgehalte im intramitochondrialen und im extramitochondrialen Raum nicht notwendigerweise zu einer subjektiv als gleichartig empfundenen Farbdichte führen müssen. Dies wird auch bei den mehrörtigen Aktivitäten anderer

Enzyme zu berücksichtigen sein.

WILLIAM, GIBBS und KAMIN (26) fanden die DPN-spezifische Tetrazoliumreduktase anhand von Homogenatfraktionen der Rattenleber zu 50 % ihrer zellulären Gesamtaktivität in den Mitochondrien, zu 42 % in den Mikrosomen und zu 8 % im Hyaloplasma. Andererseits wiesen sie nur 20 % der TPN-spezifischen Tetrazolium-Reduktase in der Mitochondrienfraktion und 80 % in der Mikrosomenfraktion nach. - Insofern wird auch anhand dieser Daten klar, daß es sich bei den histochemisch als "Tetrazolium-Reduktasen" nachweisbaren Enzymaktivitäten nur hinsichtlich der Fähigkeit zur Reduktion von Tetrazolsalzen um eine einheitliche Gruppe von Enzymen handelt. Die mit Methoden der quantitativen Aktivitätsbestimmung aufgezeigte spezifische intrazelluläre Aktivitätsverteilung von DPNH- und TPNH-Tetrazolium-Reduktase weist bereits auf die unterschiedliche funktionelle Bedeutung beider hin. So wenig die Tatsache, daß beide Enzyme oder möglicherweise beide Enzymgruppen DPN- bzw. TPN-spezifisch Wasserstoff auf Tetrazolsalze übertragen, Aussagen zur biologischen Funktion gestattet, so gering sind auch diesbezügliche Hinweise aus den Daten der intrazellulären oder intralobulären Aktivitätsverteilung. Immerhin zeigt die der intralobulären Lokalisation anderer der Atmungskette verbundener Enzyme, z.B. der SDH oder der Cytochrom-Oxydase selbst (hohe Aktivitäten in der Peripherie, niedrige Aktivitäten im Zentrum des Läppchens) genau entgegengerichtete Aktivitätsverteilung der Tetrazolium-Reduktasen, daß offensichtlich die diesen Aktivitäten zugrundeliegende Funktion nicht allein dem Wasserstofftransport im Stoffwechselabschnitt der Atmungskette zukommt. Die extramitochondrialen

Aktivitäten der DPNH- und insbesondere der TPNH-Tetrazolium-Reduktasen unterstreichen diesen Aspekt. Möglicherweise repräsentieren sie Abschnitte extramitochondrialer Cytochrom b_5 -reduzierender Reaktionsketten.

Die Verteilung der TR über das Leberläppchen ist von methodischer Wichtigkeit, da sie beim histochemischen Nachweis pyridinnucleotid-abhängiger Dehydrogenasen die oben besprochene "Indikatorreaktion" katalysieren. Die Nachweisbarkeit der pyridinnucleotid-spezifischen Dehydrogenasen über die Wirkung dieser beiden Enzyme wird beim Leberläppchen darum stets mehr oder minder auf Zellen mit ausreichender TR-Aktivität, also vor allem auf den zentralen Abschnitt beschränkt bleiben. Die so erhaltenen Befunde lassen dann Aussagen über die Verteilung pyridinnucleotid-abhängiger Dehydrogenasen in der Läppchen-Peripherie nicht zu.

Aus diesen Gründen wurde die hier durchgeführte Ortung der pyridinnucleotid-spezifischen Dehydrogenasen mit dem Gelschicht-Verfahren vorgenommen. Methodisch besteht hierbei der Vorteil, daß die in jedem Falle unentbehrliche "Indikator-Reaktion" beim Nachweis pyridinnucleotid-spezifischer Dehydrogenasen über die Reduktion von Tetrazolsalzen nicht durch die Aktivität der zellständigen TR limitiert wird. Dennoch kann eine Wasserstoffübertragung durch die Wirkung der TR auch beim Gelschicht-Verfahren nicht ausgeschlossen werden, da eine Unterdrückung ihrer Aktivitäten durch spezifische Inhibitoren vorerst nicht möglich ist. Der Ablauf der Indikatorreaktion erfolgt beim Gelschicht-Verfahren im eigentlichen Sinne des Wortes nur dort "unabhängig von der Wirkung der Diaphorasen", wo diese nicht vorhanden sind. Im

Leberläppchen sind das vornehmlich die Zellen des periportal-
feldes. Im Bereich der perizentralen Region, welche verhältnis-
mäßig hohe Aktivitäten - insbesondere der DPN-spezifischen TR -
aufweist, wirken beim Nachweis im Gelschicht-Verfahren Diaphorase
und Phenazinmethosulfat als Redoxmediatoren zugleich. Damit ist
auch im Gelschicht-Verfahren die Nachweisbarkeit pyridinnucleotid-
abhängiger Dehydrogenasen in der perizentralen Region des Leber-
läppchens gegenüber der periportal-Region begünstigt. Daraus
folgt, daß auch bei gleichmäßig über das Läppchen verteilter
Dehydrogenase-Aktivität eine verstärkte Anfärbung im Perizentral-
feld resultieren kann.

Andererseits ist aber das Beispiel der - cytoplasmatischen -
Laktatdehydrogenase von besonderer Aussagekraft:
beim Aktivitätsnachweis dieses Enzyms allein über die Wirkung
der zelleigenen Diaphorasen wird regelmäßig ein Verteilungsmu-
ster dargestellt, das perizentral höhere Aktivität anzeigt als
periportal (16). Beim Nachweis im Gelschicht-Verfahren zeigt
sich die Aktivität der Laktatdehydrogenase als zumindest gleich-
mäßig über das Läppchen verteilt, in der Regel sogar mit peri-
portal erhöhter Aktivität.

Daraus folgt, daß der histochemische Nachweis pyridin-
nucleotid-spezifischer Dehydrogenasen im Gelschicht-Verfahren
zwar keineswegs eine von Möglichkeiten der Artefaktbildung freie
Methode ist, dennoch aber dem über die alleinige Wirkung der
gewebseigenen TR geführten Nachweis überlegen ist. Möglichkeiten
der Artefaktbildung folgen hier, wie bereits erörtert, aus der
zugleich mit der spezifischen Nachweisreaktion ablaufenden Blind-
reaktion, bei der im Gewebsschnitt enthaltene Substrate PN-spezi-

fischer Dehydrogenasen oder reduziertes Pyridinnucleotid eine im Hinblick auf die Nachweisreaktion unspezifische Reduktion des Tetrazoliums bewirken. Sie ist jeweils charakterisiert durch eine mäßige Anfärbung vor allem der Zellen des perizentralen Läppchenfeldes. Berücksichtigt man diesen störenden Effekt, so lassen sich mit den im Gelschicht-Verfahren am Leberläppchen erhaltenen Ergebnissen einige interessante Feststellungen treffen. Die untersuchten Dehydrogenasen lassen nämlich in einigen Fällen durchaus unterschiedliche Typen der intralobulären Aktivitätsverteilung erkennen.

Die übrigen Oxydoreduktasen

Bei zusammenfassender Betrachtung der Ergebnisse fallen drei Verteilungstypen auf:

- a) vorwiegend perizentral verstärkte Aktivität wie im Falle der Glutamat-Dehydrogenase, der beta-HBDH und der TPN-spezifischen Isocitrat-Dehydrogenase.
- b) gleichmäßige Aktivitätsverteilung wie im Falle der Malat-Dehydrogenase und der Glycerophosphat-Oxydase.
- c) überwiegend periportal verstärkte Aktivität wie im Falle der Succino-Dehydrogenase.

Damit stellt sich die Frage, inwieweit die hier unterscheidbaren Verteilungstypen funktionelle Bedeutung haben bzw. jeweils Enzyme engen funktionellen Zusammenhangs vereinen. Zu ihrer Klärung bieten sich Vergleiche mit den Ergebnissen der Quantitativen Analyse von Enzymaktivitätsmustern (1-9,16) an.

Die Histochemie kann zur Erforschung unterschiedlicher Enzymverteilungen innerhalb von Parenchymzellen ein und desselben Organs keine quantitativen Angaben liefern. Dennoch reichen aber die hier qualitativ beobachteten Unterschiede aus, um auf bestimmte Unterschiede in der quantitativen Ordnung des Enzymmusters periportal und perizentraler Zellen zu schließen. Auf der Grundlage einer solchen qualitativen Betrachtung lassen sich dann periportale und perizentrale Parenchymzellen vergleichen wie Zellen verschiedener Organe. Ein Vergleich auf quantitativer Ebene durch Gegenüberstellung der Enzymaktivitätsmuster ist ausgeschlossen, wenn nicht die von SHANK und Mitautoren ausgearbeiteten Mikroverfahren verwendet werden. (12). Die Unterschiede der zellulären Enzymmuster in Peripherie und Zentrum des Leberläppchens lassen sich andererseits zu Befunden in Beziehung setzen, die aus der vergleichenden Analyse von Enzymaktivitäts-Mustern erhalten wurden:

Zunächst fragt man sich, inwieweit Enzyme sogenannter "Proportionskonstanter Gruppen" übereinstimmend demselben Typ der intralobulären Aktivitätsverteilung zugeordnet werden können? Eine solche Verteilung wäre aus dem Phänomen der "Proportionskonstanz" zu fordern:

von den hier untersuchten Enzymen gehören die Succino- und die Malat-Dehydrogenase der proportionskonstanten Gruppe des Zitratzyklus an. Ebenso wie das Verhältnis ihrer Aktivitäten in verschiedenen Geweben trotz erheblicher Variation der absoluten Größen zumindest angenähert, zumeist exakt konstant gefunden wird, sollte das Aktivitätsverhältnis dieser beiden Enzyme auch

in den verschiedenen Bereichen des Leberläppchens übereinstimmen. Im Falle der übrigen Enzyme, der T-IDH, der GluDH, der beta-HBDH sowie der alpha-GPOX, ist eine derartige Übereinstimmung nicht zu erwarten, da sie nach den Ergebnissen der vergleichenden Analyse von Enzymaktivitätsmustern in verschiedenen Zellen und Geweben in jeweils spezifischen Proportionen zueinander und zu den Enzymen proportionskonstanter Gruppen stehen.

Das Fehlen einer Übereinstimmung der intralobulären Verteilung der Aktivitäten von Malat- und Succino-Dehydrogenase bleibt darum auffällig, mag zum Teil aber methodisch begründet sein. Zum anderen bekräftigen die Ergebnisse von SHANK und Mitarbeitern (12) den die Malat-Dehydrogenase betreffenden Verteilungstyp. Fig. 3 zeigt die von diesen Autoren in einzelnen und aus verschiedenen Arealen des Leberläppchens der Ratte isolier-

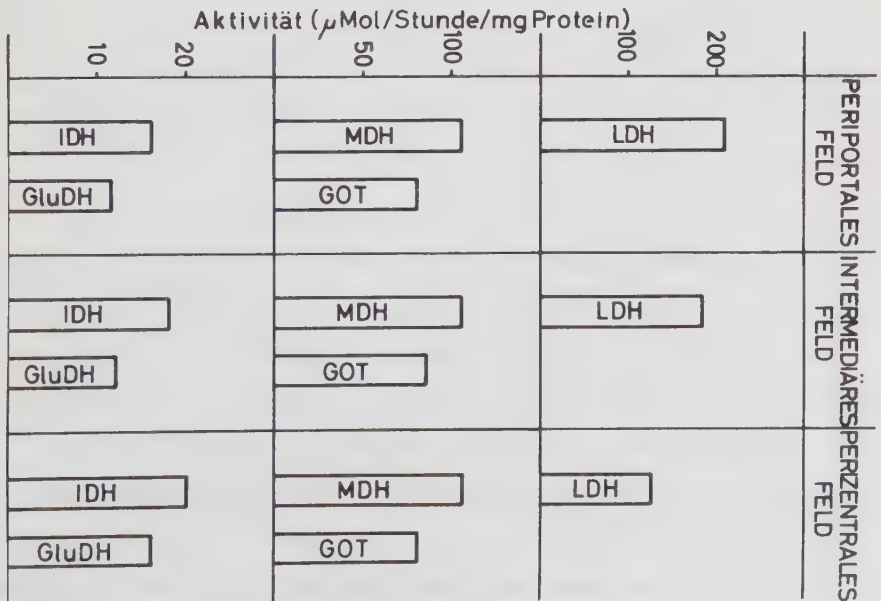


Fig. 3

ten Parenchymzellen bestimmten Aktivitätsgehalte einiger Enzyme des energieliefernden Stoffwechsels. Soweit entsprechende Enzyme untersucht wurden, besteht volle Übereinstimmung mit den in dieser Arbeit erhaltenen Befunden. - Sowohl die hier mit histochemischer Methodik durchgeführte Lokalisierung, als auch die von der Gruppe SHANKS mit quantitativer Methodik durchgeführte Aufklärung der intralobulären Aktivitätsverteilung der Malat-Dehydrogenase, erstrecken sich allein auf die gesamte zelluläre Aktivität dieses Enzyms. Tatsächlich bezieht sich die Konstanz des Aktivitäts-Verhältnisses von Malat-Dehydrogenase und Succino-Dehydrogenase nur auf den intramitochondrialen Anteil der ersteren. Die Frage, inwieweit die Konstanz dieser Proportion in den verschiedenen Zellen des Leberläppchens gewahrt ist, bleibt offen. Es kann jedoch festgestellt werden, daß das Verhältnis der gesamten zellulären Aktivität der MDH zur SDH im periportalen und perizentralen Zelltyp verschieden ist. Zu derselben Erkenntnis führten allerdings auch quantitative Analysen von Enzymaktivitätsmustern verschiedener Gewebe und Zellen.

Die der Gruppe a) angehörige TPN-spezifische Isocitrat, sowie die Glutamat- und Betahydroxybutyrat-Dehydrogenasen sind unterschiedlich auf die Zellen des Leberläppchens verteilt. Daraus folgt, daß die Proportionen ihrer Aktivitäten in den verschiedenen Leberzellen von jeweils spezifischer Größe sind. Insofern stimmen die Ergebnisse der histochemischen Ortung dieser Enzyme zumindest qualitativ mit den Befunden der quantitativen Analyse überein.

Von besonderem Interesse sind die spezifischen Proportionen der alpha-GPOX zur SDH in den verschiedenen Zonen des

Leberläppchens. Beide Enzyme sind in der mitochondrialen Struktur durch kovalente Bindungen verankert. Ihr histochemischer Aktivitätsnachweis ist, wie oben erläutert, mit den geringsten Möglichkeiten der Artefaktbildung behaftet.

SCHUMACHER hat erstmals (10) und von vielen Nachuntersuchern bestätigt, die ungleichmäßige Aktivitätsverteilung der Succino-Dehydrogenase nicht nur in der Leber der Ratte, sondern auch von anderen Säugern, klargestellt. Die hier beschriebene Verteilung dieses Enzyms in einem von periportal nach perizentral gerichteten Gefälle stimmt vollauf mit den Befunden SCHUMACHERS und anderer Autoren überein. Die unterschiedlichen Aktivitäten der mitochondrial strukturgebundenen SDH (als Repräsentant der proportionskonstanten Enzymgruppe des Citratzyklus) innerhalb des Leberläppchens berechtigen zu der Folgerung, daß möglicherweise quantitative Unterschiede im Mitochondrien-Gehalt der peripheren und der perizentralen Leberzellen bestehen.

Daß die Unterschiede zwischen Peripherie und Zentrum des Leberläppchens aber auch die Qualität der Mitochondrien betreffen, zeigt eindeutig ein Vergleich der Aktivitätsverteilung von SDH und GPOX. Wie gesagt, sind beide Enzyme in der Struktur der Mitochondrien verankert. Dennoch repräsentieren beide ganz unterschiedliche Typen der intralobulären Aktivitätsverteilung. Bei der Gegenüberstellung beider Enzyme bietet sich die GPOX aufgrund ihrer gleichmäßigen Aktivitätsverteilung als Bezugsgröße an. Die Proportion SDH/GPOX nimmt dann von der Peripherie in Richtung auf das Zentrum des Läppchens konstant ab; das heißt,

die Mitochondrien der peripheren und diejenigen der perizentralen Parenchymzellen unterscheiden sich klar in der Größe dieser Proportion.

Wird die Succino-Dehydrogenase als proportionskonstantes Enzym des Citratzyklus und damit als Träger einer mitochondrialen "Normfunktion" stellvertretend für den zellulären Gehalt an Mitochondrien angesehen, so folgt, daß die Zahl der Mitochondrien in den perizentralen Zellen des Läppchens gegenüber den periportal Zellen vermindert ist.

Wenn dennoch die Aktivität der alpha-GPOX im Läppchenzentrum gleichstark vertreten ist wie in der Peripherie, so ergibt sich, daß die Aktivität dieses Enzyms pro Mitochondrion von der Peripherie zum Zentrum relativ ansteigt. Dies gilt aber vor allem auch für die von periportal nach perizentral zunehmenden Aktivitäten der TPN-spezifischen IDH, der GluDH und der beta-HBDH.

Ein analoges Beispiel bietet die Verteilung dieser beiden Cytochrom reduzierenden Enzyme in der Niere: Abb. 11 zeigt das Aktivitäts-Histogramm der Succino-Dehydrogenase, Abb. 12 dasjenige der alpha-Glycerophosphat-Oxydase in der Rattenniere. Beide Photos umfassen in circa 8-facher Vergrößerung den gesamten Nierenquerschnitt. Im Gegensatz zum Leberläppchen ist an der Niere die SDH völlig gleichmäßig verteilt (Abb. 11), während die GPOX eindeutig lokale Unterschiede aufweist. Aus Abb. 12 geht die im Nierenmark gegenüber der Nierenrinde kräftig erhöhte Aktivität der alpha-GPOX hervor. Bei

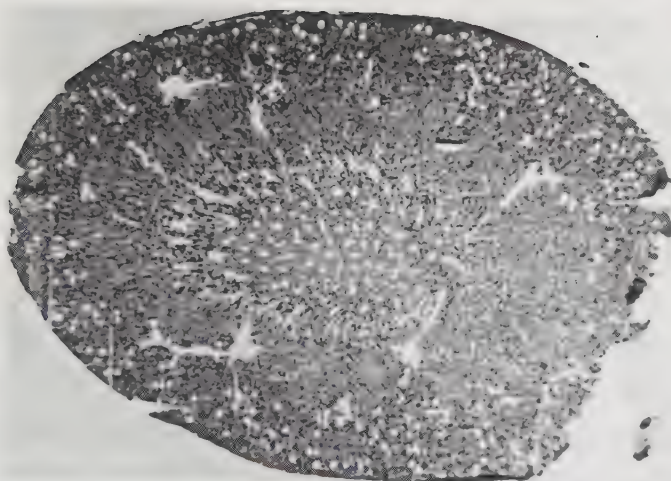


Abb.11



Abb.12

stärkerer Vergrößerung kann man eine starke Anfärbung der Epithelien der ab- und aufsteigenden Henleschen Schleifen erkennen, während die in Glomerulurnähe sowie im Kelchbereich befindlichen Nierenkanälchen ungefärbt sind.

Hinsichtlich der Proportion beider Enzyme unterscheiden sich also die Mitochondrien des Nierenmarks von denjenigen der Nierenrinde in geradezu auffallender Weise, sodaß auch hier dieser Befund nur eine Erklärung in der Annahme unterschiedlicher Mitochondrientypen findet.

Die inzwischen mit Erfolg aufgenommenen Versuche zur Isolierung und weiteren Charakterisierung verschiedener Mitochondrien-Typen aus Rattenleber (PETTE und BRDICZKA 1964, unveröffentlicht) bestätigen schließlich die mit der histochemischen Technik erkannten Unterschiede.

Die Frage nach der Bedeutung der unterschiedenen Typen der Enzymverteilung kann aufgrund der erzielten Resultate sicherlich nur unvollkommen beantwortet werden. Diesbezügliche Hinweise ergeben sich freilich aus der funktionellen Zuordnung der einzelnen Enzyme im Netzwerk des energieliefernden Stoffwechsels, sowie aus Beziehungen zur Architektur des Leberläppchens. SCHUMACHER hat in diesem Sinne die Verteilung der Succino-Dehydrogenase als Ausdruck eines intralobulären Gefälles in der Sauerstoffversorgung diskutiert. Folgt man seinen Überlegungen, so stehen in der Peripherie des Läppchens vor allem aerob ablaufende Stoffwechsel-Prozesse im Vordergrund. Die Mitochondrien des peripheren Läppchen-Areals stünden dann vor allem im Dienste der oxydativen energetischen Transformation. Entsprechende Über-

legungen führen zu der Annahme, daß die Mitochondrien-Population des perizentralen Leberfeldes im Dienste solcher Funktionen steht, die von den in ihnen mit hoher Aktivität enthaltenen Enzymen getragen werden. Im Hinblick auf die TPN-spezifische IDH und auf die GluDH ergeben sich Hinweise auf das Vorherrschen TPN- bzw. TPNH-abhängiger Reaktionen, zum Beispiel Biosynthesen, Hydroxylierungen, und auf Stoffwechselprozesse in Zusammenhang mit der oxydativen Desaminierung der Glutaminsäure bzw. der reduktiven Aminierung der Alpha-Keto-Glutarsäure im Aminosäurestoffwechsel und ihrer Verbindungen zu anderen Reaktionszweigen, beispielsweise der Harnstoffsynthese.

Die Auswahl der untersuchten Enzyme reicht nicht aus, um eine erschöpfende Charakterisierung der in den unterschiedlichen Läppchenarealen ablaufenden Prozesse zu geben. Immerhin lassen sich aber an den wenigen hier behandelten Beispielen deutliche Hinweise auf die funktionelle Verschiedenartigkeit im Bereich der mitochondrialen Population des Leberläppchens gewinnen.

Z u s a m m e n f a s s u n g

Unter Anwendung histochemischer Techniken, insbesondere des Gelschicht-Verfahrens, wurde die Aktivitätsverteilung pyridinnucleotid-abhängiger und cytochrom-reduzierender Dehydrogenasen am Leberläppchen der ausgewachsenen Ratte untersucht. Folgende Befunde wurden erhalten:

Die Verteilung mitochondrialer Oxydoreduktasen im Leberläppchen ist durch besondere Merkmale ausgezeichnet. So lassen sich drei unterschiedliche Typen der intralobulären Aktivitätsverteilung herausstellen: Succinat-DH ist in den periportalen Parenchymzellen mit höherer Aktivität vertreten als in den perizentralen. Im Gegensatz dazu ist die gleichfalls intramitochondrial strukturgebundene Alpha-Glycerophosphat-Oxydase in allen Parenchymzellen des Leberläppchens mit vergleichbarer Aktivität nachweisbar. Diesem Typ der gleichmäßigen Aktivitätsverteilung kann auch die Malat-Dehydrogenase zugeordnet werden. Unklar bleibt allerdings, inwieweit extra- und intramitochondriale Aktivitäten der MDH, die beim histochemischen Test nicht unterschieden werden können, in den periportal und perizentralen Zellen in gleichem Verhältnis zueinander stehen. Ausgeprägte Unterschiede in den zellulären Aktivitätsgehalten finden sich innerhalb des Leberläppchens bei der TPN-spezifischen IDH, bei der GluDH und der Beta-Hydroxybutyrat-DH. Diese Enzyme finden sich ebenso wie die DPN- und TPN-spezifischen Tetrazolium-Reduktasen mit wesentlich höherer Aktivität in den Zellen des perizentralen Läppchenfeldes als in den Parenchymzellen der Läppchenperipherie.

Die dargelegten Befunde führen zum Versuch einer funktionellen Zuordnung. So weisen die in verschiedenen Läppchenbezirken bestehenden Unterschiede der Aktivitätsgehalte einzelner mitochondrialer Dehydrogenasen sowohl auf Unterschiede in der Zahl als auf Unterschiede in der Qualität der Mitochondrien hin. Als beweisendes Argument für eine Verschiedenartigkeit der Mitochondrien in Peripherie und im Zentrum des Leberläppchens

werden die aus den Ergebnissen des histochemischen Nachweises abschätzbaren spezifischen Proportionen einiger Aktivitäten, so vor allem der SDH und GPOX herangezogen. Die unterschiedliche Histotopik dieser beiden Enzyme in der Niere weist auf eine entsprechende Heterogenität der Mitochondrienpopulation auch dieses Organs hin.

L e g e n d e zu den Abbildungen.

- Abb. 1) Aktivitäts-Histiotogramm der DPNH-Tetrazolium-Reduktase (DPN-"Diaphorase"): Seite 22
perizentral verstärkte Anfärbung des Leberläppchens am nichtextrahierten Schnitt.
120-fache Vergr.. Herkömmliche Färbemethode.
- Abb. 2) Aktivitäts-Histiotogramm der DPNH-Tetrazolium-Reduktase: Vorextraktion des Gewebsschnittes.
Perizentral verstärkte Anfärbung. 50-fache Vergrößerung. Herkömmliches Färbeverfahren.
- Abb. 3) Aktivitäts-Histiotogramm der DPNH-Tetrazolium-Reduktase: palisadenartige Anfärbung in der Muscularis einer Leber-Arterie. Die Vene ist weitgehend ungefärbt. 340-fache Vergrößerung. Seite 24

- Abb. 4) Aktivitäts-Histogramm der TPNH-Tetrazolium- Seite 24
Reduktase (TPN-"Diaphorase"): perizentral
verstärkte Färbung nach Vorextraktion des
Schnittes. 50-fache Vergr.. Gelschicht-Methode
- Abb. 5) Aktivitäts-Histogramm der TPN-spezifischen Seite 27
Isocitrat-Dehydrogenase: perizentral verstärk-
te Anfärbung des nichtextrahierten Schnittes.
30-fache Vergrößerung. Gelschicht-Verfahren.
- Abb. 6) Aktivitäts-Histogramm der Malat-Dehydrogenase:
gleichmäßige bis schwach perizentral verstärkte
Anfärbung am nichtextrahierten 10-nm-Schnitt.
30-fache Vergrößerung. Gelschicht-Verfahren.
- Abb. 7) Aktivitäts-Histogramm der Glutamat-Dehydroge- Seite 29
nase: kräftig perizentral verstärkte Anfärbung
des nichtextrahierten Schnittes. 25-fache Ver-
größerung. Gelschicht-Verfahren.
- Abb. 8) D-(-)-Beta-Hydroxybutyrat-Dehydrogenase: das
Aktivitätshistogramm des Leberläppchens zeigt
nur perizentral eine Anfärbung. 100-fache Ver-
größerung. Gelschicht-Verfahren.
- Abb. 9) Aktivitätshistogramm der Succino-DH: Seite 32
periportal verstärkte Anfärbung nach Vorex-
traktion des Schnittes. 80-fache Vergr.
- Abb. 10) Alpha-Glycerophosphat-Oxydase: völlig gleich-
mäßige Aktivitätsverteilung. 50-fache Vergr.
Herkömmliches Färbeverfahren wie Abb. 9)
- Abb. 11) Aktivitätshistogramm der Succino-Dehydroge- Seite 45
nase an der Ratten-Niere: völlig gleichmäßige
Verteilung. 8-fache Vergrößerung.
- Abb. 12) Aktivitätshistogramm der Alpha-GPOX an der
Ratten-Niere: nur die Strukturen des Nieren-
marks sind gefärbt. 8-fache Vergrößerung.

L i t e r a t u r - V e r z e i c h n i s

- 1) Vogell, W., F.R. Bishai, Th. Bücher, M. Klingenberg, D. Pette
u. E. Zebe; Biochem. Z. 332, 81 (1959)
- 2) Bücher, Th.; Boll. Soc. Ital. Biol. Sperim. 36, 1509 (1960)
- 3) Bücher, Th. u. D. Pette; Proc. Internat. Congr. Bioch., Vth.
Congr. Moscow 1961, Pergamon Press, London.
- 4) Pette, D., W. Luh u. Th. Bücher; Bioch. B. Res. Comm. 7, 419 (1962)
- 5) Pette, D., M. Klingenberg u. Th. Bücher; Bioch. Bioph. Res. Comm.
7, 425 (1962)
- 6) Pette, D. u. W. Luh; Bioch. Bioph. Res. Comm. 8, 283 (1962)
- 7) Delbrück, A., E. Zebe u. Th. Bücher; Bioch. Z. 331, 273 (1959)
- 8) Pette, C. u. Th. Bücher in Hoppe-Seyler's Z. F. Physiol. Chemie,
Bd. 331, S. 180-195 (1963)
- 9) Bücher, Th. u. D. Pette; 103. Versammlung Ges. Dtsch. Naturf. u.
Ärzte, Weimar 1964
- 10) Schumacher, H. H.; Science 125, 501 (1957)
- 11) Kritzig, W. u. H. H. Schumacher; Z. Zellforsch. u. mikrosk. Anat.
54, 443 (1961)
- 12) Shank, R. E., Morrison, G., Ch. H. Cheng, I. Karl u. R. Schwartz;
J. Histochem. Cytochem. 7, 237 (1959)
- 13) Hogeboom, G. H., W. C. Schneider u. G. E. Palade; Journal Biol.
Chem. 172, 619 (1948)
- 14) Pette, D., W. Vogell u. H. Brandau; V. internat. Kongr. f.
Elektronenmikr., Philadelphia 1962
- 15) Fleisher, G. A., C. S. Potter u. K. G. Wakim; Proc. Soc. exp.
Biol. Med. 103, 229 (1960)

- 16) Pette,D.; Habilit.-Arbeit Med.Fakultät Univ. Marburg 1963
- 17) Williams,Ch.H.jr., R.H.Gibbs, u.H.Kamin; Biochim.Biophys.
Acta (Amsterdam) 32, 568 (1959)
- 18) Hess, Scarpelli u.A.G.E.Pearse; J.B.B.Cytol. 4, 753 (1958)
- 19) Pearse,A.G.E., "Histochemistry", London 1963
- 20) Pette,D. u.H.Brandau; Enzymol.biol.clin. (1962)
- 21) Pette,D. u.H.Brandau; Bioch.Biophys.Res.Comm. 9, 367 (1962)
- 22) Kuhn,R. u.D.Jerchel; Ber.Dtsch.chem.Ges. 74 B, 941 (1941)
- 23) Brandau,H.; Diss. Med.Fakult.d.Univ.Marburg 1964
- 24) Goebell,H. u.M.Klingenberg; Bioch.Z. 340, 441 (1964)
- 25) Bücher,Th., Luh,W. u.D.Pette in Hoppe-Seyler/Thierfelder,
Handb.f.Physiol.Chemie Bd.VI/A (1964)
- 26) Williams,Ch.H.jr., R.H.Gibbs, u.H.Kamin; Biochim.Biophys.
Acta (Amsterdam) 32, 568 (1959)
- 27) Frieden,C., Vith internat.Congr.Biochem., New York 1964,
abstr. IX-24
- 28) Lehninger,A.L., H.C.Sudduth, a.J.B.Wise; J.biol.Chem.
235, 2450 (1960)

Lebenslauf.

Am 24. Mai 1938 wurde ich als Sohn des Internisten Dr.med. Kurt Weidner und seiner Frau Sophie Weidner, geb. Oberländer, in Tübingen am Neckar geboren. Nach den Volksschuljahren in Feldkirch/Vorarlberg und Passau besuchte ich dort die Oberrealschule. Meine besonderen Interessen gelten seither den Fremdsprachen, den naturwissenschaftlichen Problemen und der Musik. Nach bestandenem Abitur im Sommer 1957 studierte ich bis zum Physikum in München Medizin. Darauf folgten klinische Semester in Kiel, Innsbruck, München und Würzburg, wo ich das Medizinische Staatsexamen im August 1963 mit gutem Erfolg absolvierte. Als Medizinalassistent war ich zunächst vier Monate an der Chirurgischen Klinik der Medizinischen Akademie in Düsseldorf, dann vierzehn Monate am Physiologisch-Chemischen Institut der Universität München, dann vier Monate in der ersten Münchener Universitätsfrauenklinik. Meine Zukunftspläne gelten der klinischen Dermatologie.

Mein aufrichtiger Dank gilt dem Direktor des Physiologisch-Chemischen Instituts in München, Herrn Professor Dr.Dr.med.h.c. Theodor Bücher, der mir ein Arbeiten unter günstigsten Voraussetzungen in freundlichem Milieu ermöglichte. - Weiterhin möchte ich Herrn Dozent Dr.med.Dirk Pette und seinen Mitarbeitern für ihre selbstlose Unterstützung mit Rat und Tat meinen besonderen Dank aussprechen.

München, den 18.6.65.

